

DETERMINACIÓN DE LIGNINA Y CELULOSA EN HOJAS DE PLANTAS LEÑOSAS MEDIANTE NIRS: COMPARACIÓN DE MÉTODOS ESTADÍSTICOS

C. PETISCO¹, A. GARCÍA CIUDAD¹, B.R. VÁZQUEZ DE ALDANA¹,
I. ZABALGOGEAZCOA¹, S. MEDIAVILLA² Y B. GARCÍA CRIADO¹.

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Apdo. 257, 37071 Salamanca.

²Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca.

RESUMEN

Se han obtenido ecuaciones de calibración mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS), para la determinación de lignina y celulosa en muestras de hojas de 18 especies leñosas, comparando los resultados obtenidos por regresión lineal múltiple (MLR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR). Las especies proceden de zonas montañosas, ribereñas y relativamente secas de la región Centro-Oeste de la Península Ibérica. Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración, se utilizan 183 muestras y se consideran tres transformaciones matemáticas: log 1/R, primera y segunda derivada. El análisis de lignina y celulosa resultó más satisfactorio mediante PLSR. Con este tratamiento, se consiguieron mejores resultados utilizando la primera derivada; sin embargo, con MLR se consiguieron mejores estadísticos con log 1/R. Los coeficientes de determinación múltiple (R^2) y los errores estándar de calibración (SEC) con MLR, fueron 0,88 y 1,29 para lignina, y 0,97 y 1,02 para celulosa. Con PLSR mejoraron notablemente éstos estadísticos, alcanzándose $R^2=0,96$, $SEC=0,88$ para lignina, y $R^2=0,98$, $SEC=0,75$ para celulosa; los errores estándar de validación cruzada (SECV) fueron 1,19 y 0,93, respectivamente. En la validación externa se obtuvieron errores estándar de predicción (SEP) de 1,03 y 0,96 con MLR y 0,85 y 0,86 con PLSR, para lignina y celulosa.

Palabras clave: Especies leñosas, NIRS, lignina, celulosa.

DETERMINATION OF LIGNIN AND CELLULOSE CONTENT IN LEAVES OF WOODY PLANTS BY NIRS: COMPARISON OF STATISTICAL METHODS

SUMMARY

Calibration equations were obtained to determine lignin and cellulose content in leaf samples of 18 woody species by near infrared spectroscopy (NIRS). Plant species were typical of mountain, riparian, and relatively dry areas from the West-Central Iberian Peninsula. Two regression methods, multiple linear regression (MLR) and partial least squares regression (PLSR) were compared. To develop calibration equations, a set of 183 samples were used and three mathematical transformations were applied: log 1/R, first and second derivative. The best results for lignin and cellulose analysis were obtained by means of PLSR. Using this treatment, the best results were achieved with the first derivative; however, with MLR we obtained better statistics using log 1/R. Coefficients of multiple determination (R^2) and standard errors of calibration (SEC) with MLR, were 0.88 and 1.29

for lignin, and 0.97 and 1.02 for cellulose. These statistics were improved by PLSR: $R^2=0.96$, $SEC=0.88$ for lignin, and $R^2=0.98$, $SEC=0.75$ for cellulose; the standard errors of cross validation (SECV) were 1.19 and 0.93, respectively. In the external validation the standard errors of prediction (SEP) for lignin and cellulose determination were 1.03 and 0.96 with MLR, and 0.85 and 0.86 with PLSR.

Key words: Woody species, NIRS, lignin, cellulose.

INTRODUCCIÓN

El clima, las características del suelo, los organismos edáficos y la calidad de la materia orgánica que ha de sufrir el proceso, constituyen los principales factores reguladores de la descomposición. Aunque la importancia conferida a cada uno de dichos factores como predictores de la tasa de descomposición de la hojarasca es diferente en distintos ambientes, es innegable, en cualquier caso, el papel determinante jugado por la composición química de las hojas, cuyas relaciones con la tasa de descomposición han sido intensamente estudiadas (Meentemeyer, 1978; Heal *et al.*, 1997).

Además del nitrógeno, la lignina ha sido uno de los constituyentes foliares, más ampliamente utilizados como índice de calidad de la materia vegetal, y su concentración tradicionalmente considerada como uno de los principales predictores de las tasas de descomposición (Meentemeyer, 1978). No es menor, sin embargo, la contribución de otros componentes foliares, como la celulosa, para explicar el ritmo al que se degrada la materia orgánica de origen vegetal (Melillo *et al.*, 1989). Identificar, por tanto, las diferencias en el contenido de estos constituyentes entre diversos tipos de hoja, puede resultar de gran importancia para comprender las tasas de descomposición de la hojarasca en distintas especies. Además, la descomposición afecta a la producción primaria, gobernando el suministro de nutrientes mineralizados a la planta (Kitayama *et al.*, 2004), explicando en cierta medida, sus diferencias en productividad.

El análisis químico de tejidos vegetales está bastante estandarizado, pero en muchos casos supone una considerable inversión de tiempo, especialmente para lignina y celulosa, que requieren complicados procedimientos de laboratorio (Goering y Van Soest, 1970). Desde la aparición de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) hasta la actualidad, los resultados satisfactorios obtenidos en diversos estudios, han confirmado a la técnica NIRS como una alternativa rápida y fiable para el análisis de constituyentes vegetales. La mayor parte de estos estudios, se han llevado a cabo con productos agrícolas, pudiendo considerarse aún escasa su aplicación al análisis de la composición de muestras de plantas leñosas (Wessman *et al.*, 1988; Meuret *et al.* 1993; Bolster *et al.*, 1996; Mc Tiernan *et al.* 2003; Ono *et al.*, 2003; García-Ciudad *et al.*, 2004).

El objetivo del trabajo es evaluar el potencial de NIRS, comparando dos métodos de regresión, para la determinación del contenido de celulosa y lignina en hojas de un amplio conjunto de especies leñosas, arbóreas y arbustivas, localizadas todas ellas en una misma región de clima mediterráneo frío. Dicho conjunto de especies incluye representantes de diversos hábitos y características foliares, lo que nos proporciona un amplio intervalo de variación en los valores de los constituyentes químicos objeto del presente estudio,

totalmente deseable para tratar de desarrollar ecuaciones que nos permitan determinar la naturaleza del material vegetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se consideran muestras de hojas de 18 especies leñosas distribuidas en seis zonas de la región Centro-Oeste de la Península Ibérica (provincias de Salamanca y Zamora). Según su distribución en las áreas seleccionadas, se establecieron tres grupos de especies: ribereñas (*Frangula alnus*, *Fraxinus angustifolia* y *Sambucus nigra*), de montaña (*Pinus sylvestris*, *Acer monspessulanum* y *Betula pubescens*) y especies típicas de áreas relativamente secas (*Crataegus monogyna*, *Pyrus bourgaeana*, *Quercus faginea*, *Q. pyrenaica*, *Q. rotundifolia*, *Q. coccifera*, *Q. suber*, *Pinus halepensis*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *Taxus baccata* e *Ilex aquifolium*). En cada zona, se eligieron al azar cuatro o cinco muestras, compuestas por ramas con hojas procedentes de diferentes posiciones de las plantas leñosas. Los muestreos se realizaron semanalmente durante la estación de crecimiento. Las hojas se separaron en clases según su edad, obteniéndose un total de 183 muestras que fueron secadas en estufa de aire forzado a 60° C y molidas (tamiz de malla de 1 mm). Las concentraciones de lignina y celulosa se determinaron usando el método descrito por Goering y Van Soest (1970).

Los espectros NIR de las 183 muestras de hojas se registraron con un equipo Technicon InfraAlyzer 500, desde 1100 a 2500 nm, como log 1/R (R=Reflectancia). Teniendo en cuenta características espectrales, mediante el programa PICKS (InfraAlyzer Data Analysis System, Technicon Instrument Corporation, Tarrytown, NY) se seleccionaron 112 muestras para el proceso de calibración, constituyendo las 71 muestras restantes el grupo de validación. El desarrollo de las calibraciones se efectuó empleando dos métodos de regresión: Regresión lineal múltiple (MLR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), que fueron comparados considerándose tres tratamientos matemáticos: log 1/R, primera derivada (1D) y segunda derivada (2D). Finalmente, para evaluar el modelo de calibración se realizó una validación externa empleando las ecuaciones óptimas de calibración para predecir el contenido de lignina y celulosa de las muestras de validación. La exactitud de las predicciones se estimó mediante un análisis de regresión simple entre los valores predichos por NIRS y los obtenidos con los métodos de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los contenidos de lignina y celulosa, estimados por el método de referencia, de las 18 especies de plantas leñosas incluidas en este estudio. *Taxus baccata* es la especie que presenta mayor coeficiente de variación (CV) para ambos parámetros (30,4% y 63,5% para lignina y celulosa, respectivamente); seguida de *Quercus pyrenaica* en el caso de lignina (29,5%), y de *Quercus suber* para celulosa (18,6%). Por el contrario, especies como *Frangula alnus* (2,8%) y *Betula pubescens* (4,3%), tienen baja variabilidad para lignina, mientras que dichos coeficientes son bajos para *Crataegus monogyna* (3,9%) y *Quercus pyrenaica* (4%), cuando el parámetro analizado es celulosa.

En la Tabla 2 aparecen reflejados los valores extremos, media y desviación estándar (SD) de las concentraciones de lignina y celulosa de los grupos de muestras de calibración y validación. Se aprecia un amplio intervalo de variación en ambos grupos de muestras, causado no sólo por diferencias entre especies, sino también por la diferente edad de las hojas dentro de cada una de las especies consideradas. Se observa también que los márgenes de variación del grupo de validación están incluidos en los de calibración.

Tabla 1. Contenidos de lignina y celulosa en las 18 especies de plantas leñosas.

Especies	n	Lignina (%)			Celulosa (%)		
		Rango	Media	SD	Rango	Media	SD
<i>Acer monspessulanum</i>	4	7,00-8,05	7,40	0,45	10,87-12,71	11,90	0,89
<i>Betula pubescens</i>	4	12,32-13,55	12,95	0,55	10,16-12,63	12,01	1,24
<i>Crataegus monogyna</i>	6	7,71-14,87	12,07	2,75	11,89-13,21	12,78	0,50
<i>Frangula alnus</i>	3	3,45-3,63	3,52	0,10	6,58-8,29	7,47	0,86
<i>Fraxinus angustifolia</i>	4	12,74-15,55	14,09	1,25	10,89-11,97	11,38	0,54
<i>Ilex aquifolium</i>	8	12,39-14,05	13,14	0,60	10,82-14,61	13,11	1,37
<i>Pinus halepensis</i>	20	11,01-13,45	12,35	0,69	14,68-21,91	18,14	1,79
<i>Pinus pinaster</i>	16	15,29-20,87	17,01	1,45	21,08-27,08	23,41	1,95
<i>Pinus pinea</i>	23	8,26-13,45	11,33	1,27	16,00-20,63	18,31	1,35
<i>Pinus sylvestris</i>	12	11,58-18,26	13,90	1,60	17,00-24,50	20,47	2,08
<i>Pirus bourgaeana</i>	5	14,50-21,61	18,30	2,72	14,58-16,21	15,37	0,64
<i>Quercus coccifera</i>	8	12,32-15,55	14,30	1,35	17,39-20,21	18,66	1,03
<i>Quercus faginea</i>	7	10,34-13,71	11,92	1,07	15,21-18,74	17,18	1,26
<i>Quercus pyrenaica</i>	6	6,34-13,18	9,42	2,78	15,76-17,66	16,47	0,65
<i>Quercus rotundifolia</i>	13	10,30-14,11	12,22	1,07	19,00-24,95	22,18	2,01
<i>Quercus suber</i>	10	9,18-19,18	15,15	3,16	12,55-23,76	19,02	3,53
<i>Sambucus nigra</i>	1		3,53			10,11	
<i>Taxus baccata</i>	33	10,58-27,45	18,28	5,55	5,79-31,26	13,52	8,58
Total	183	3,45-27,45	13,85	4,22	5,79-31,26	17,10	5,41

n: Número de muestras; SD: Desviación estándar

Tabla 2. Rango, media y desviación estándar de los contenidos de lignina y celulosa en las muestras de calibración y validación.

COMPONENTE	GRUPO	n	RANGO	MEDIA	SD
Lignina (%)	Calibración	112	3,45-27,45	13,31	4,17
	Validación	71	7,24-27,05	14,71	4,18
Celulosa (%)	Calibración	112	5,79-31,26	16,45	5,54
	Validación	71	6,08-26,58	18,12	5,09

n: Número de muestras; SD: Desviación estándar

Los resultados de las calibraciones se resumen en la Tabla 3. Los estadísticos son mejores con regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), que con regresión lineal múltiple (MLR) para los dos parámetros estudiados. Al comparar tratamientos matemáticos en cada método de regresión, las ecuaciones más exactas se obtienen a partir de log 1/R con MLR y de primera derivada con PLSR; con estos tratamientos se alcanzan coeficientes de determinación (R^2) de 0,88 y 0,96 para lignina y 0,97 y 0,98 para celulosa, respectivamente. Los errores estándar de calibración (SEC) obtenidos con MLR, fueron 1,29 y 1,02 para lignina y celulosa, respectivamente. Con PLSR se alcanzaron errores más bajos (SEC=0,88 para lignina y SEC=0,75 para celulosa); los errores estándar de validación cruzada (SECV) fueron 1,19 y 0,93, respectivamente.

Tabla 3. Estadísticos de calibración y validación para regresión lineal múltiple (MLR) y regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR).

MLR				PLSR			
	Log 1/R	1D	2D		Log 1/R	1D	2D
Lignina (%)							
Grupo de calibración							
Long.onda	6	6	6	Factores	14	10	10
R ²	0,88	0,87	0,88	R ²	0,95	0,96	0,97
SEC	1,29	1,43	1,38	SEC	0,90	0,88	0,76
				SECV	1,25	1,19	1,45
Grupo de validación							
r ²	0,90	0,89	0,89	r ²	0,93	0,95	0,89
SEP	1,03	1,06	1,09	SEP	0,93	0,85	1,11
Celulosa (%)							
Grupo de calibración							
Long.onda	6	6	6	Factores	10	9	6
R ²	0,97	0,96	0,97	R ²	0,97	0,98	0,98
SEC	1,02	1,17	1,03	SEC	0,93	0,75	0,85
				SECV	1,07	0,93	1,10
Grupo de validación							
r ²	0,96	0,94	0,96	r ²	0,97	0,97	0,96
SEP	0,96	1,03	1,00	SEP	0,88	0,86	0,98

R: Reflectancia; 1D: Primera derivada; 2D: Segunda derivada; R^2 : Coeficiente de determinación múltiple; SEC: Error estándar de calibración; SECV: Error estándar de validación cruzada; r^2 : Coeficiente de determinación; SEP: Error estándar de predicción.

En la validación externa se corroboran los mejores resultados con PLSR y 1D, consiguiéndose $r^2=0,95$ (lignina) y $r^2=0,97$ (celulosa). Los errores estándar de predicción (SEP), con valores de 0,85 y 0,86 para lignina y celulosa respectivamente, son notablemente más bajos que los obtenidos con MLR (SEP=1,03 para lignina y SEP= 0,96 para celulosa). Las regresiones óptimas a partir de las 71 muestras empleadas en la validación externa, se representan en la Figura 1.

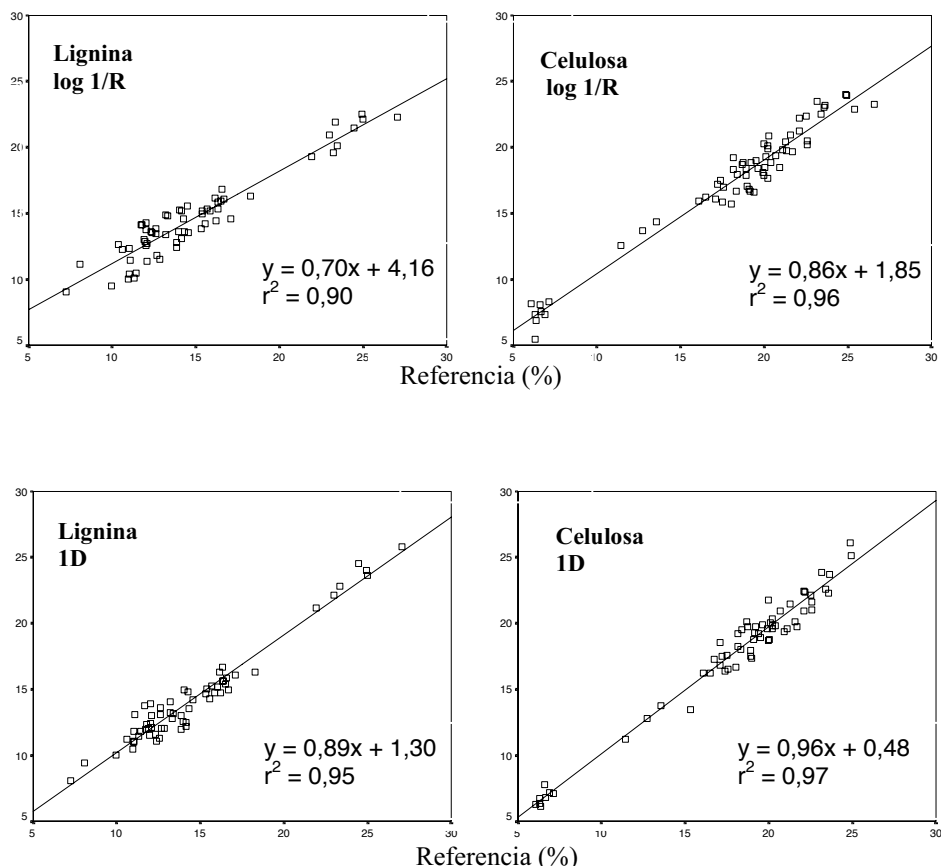


Figura 1. Relación entre valores predichos por NIRS y obtenidos por el método de referencia (validación externa). MLR: Regresión lineal múltiple, PLSR: Regresión por mínimos cuadrados parciales, R: Reflectancia, 1D: Primera derivada.

Williams y Sobering (1993) señalan valores para la relación SD/SEP superiores a 3, como adecuados para el empleo de la técnica NIRS con criterios de diagnóstico e investigación. En este trabajo se alcanzan valores de 4,9 y 5,9 para lignina y celulosa, respectivamente.

Varios autores han obtenido resultados similares para la predicción del contenido de lignina y celulosa: Meuret *et al.* (1993) en muestras procedentes de diversos árboles y arbustos mediterráneos y McTiernan *et al.* (2003) y García Ciudad *et al.* (2004) en poblaciones monoespecíficas de *Pinus sylvestris* y *Cytisus multiflorus*, respectivamente. Sin embargo, otros autores como Ono *et al.* (2003), Wessman *et al.* (1988) y Bolster *et al.* (1996), analizando muestras arbóreas también heterogéneas, obtienen errores más elevados y menores coeficientes de determinación que los recogidos en este trabajo.

Se puede concluir que NIRS posee potencial suficiente para la estimación con exactitud adecuada, de los contenidos de lignina y celulosa en una población de muestras muy heterogénea. Se obtienen mejores ajustes en la estimación de celulosa que en la de lignina, y para ambos constituyentes, PLSR conduce a estadísticos más satisfactorios.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del MEC: AGL2002-02766 AGR-FOR. Los autores agradecen la ayuda técnica prestada por J.C. Estévez, M. Miguélez y L. Brandón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLSTER, K.L.; MARTÍN, M.E.; ABER, J.D., 1996. Determination of carbon fraction and nitrogen concentration in tree foliage by near infrared reflectance: a comparison of statistical methods. *Can. J. For. Res.*, **26**, 590-600.

GARCÍA CIUDAD, A.; FERNÁNDEZ, B.; GUTIÉRREZ, Y.; VÁZQUEZ DE ALDANA, B.R.; ZABALGOGUEAZCOA, I.; GARCÍA CRIADO, B., 2004. Use of NIR spectroscopy to assess the nutritive value of a mediterranean shrub. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **35**, 665-678.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J., 1970. *Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)*. Agricultural Handbook nº 379, 20 pp. ARS-USDA, Washington DC.

HEAL, O.W.; ANDERSON, J.W.; SWIFT, M.J., 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. En: *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*, 3-45. Ed. CADISEH, G. GILLER, K.E. CAB International, Wallingford.

KITAYAMA, K.; SUZUKI, S.; HORI, M.; TAKYU, M.; AIBA, S.I.; MAJALAP-LEE, N.; KIKUZAWA, K., 2004. On the relationships between leaf-litter lignin and net primary productivity in tropical rain forest. *Oecologia*, **140**, 335-339.

McTIERNAN, K.B.; COÛTEAUX, M.M.; BERG, B.; BERG, M.P.; CALVO DE ANTA, R.; GALLARDO, A.; KRATZ, W.; PIUSSI, P.; REMACLE, J.; VIRZO DE SANTO, A., 2003. Changes in chemical composition of *Pinus sylvestris* needle litter during decomposition along European coniferous climatic transect. *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 801-812.

MEENTEMEYER, V., 1978. Macroclimate and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. *Ecology*, **59**, 465-472.

MELILLO, J.M.; ABER, J.D.; LINKINS, A.E.; RICCA, A.; FRY, B.; NADELHOFFER, K.J., 1989. Carbon and nitrogen dynamics along decay continuum: plant litter to soil organic matter. En: *Ecology of arable land*, 53-62. Ed. CLARHOLM, M., BERGSTRÖM, L. Kluwer, Dordrecht.

MEURET, M.; DARDENNE, P.; BISTON, R.; POTY, O., 1993. The use of NIR in predicting nutritive value of Mediterranean tree and shrub foliage. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1**, 45-54.

ONO, K.; HIRAIDE, M.; AMARI, M., 2003. Determination of lignin, holocellulose, and organic solvent extractives in fresh leaf, litterfall, and organic material on forest floor using near-infrared reflectance spectroscopy. *J. For. Res.*, **81**, 191-198.

WESSMAN, C.A.; ABER, J.D.; PETERSON, D.L.; MELILLO, J.M., 1988. Foliar analysis using near infrared reflectance spectroscopy. *Can. J. For. Res.*, **18**, 6-11.

WILLIAMS, P.C.; SOBERING, D.C., 1993. Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **1**, 25-32.